云 南 植 物 研 究　1993; **15** (1): 61—65
Acta Botanica Yunnanica

三七愈伤组织分化的研究*

甘烦远　周立刚　郑光植
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)
武　逵　　李建明
(云南省药材公司，昆明 650031)

摘要　对三七（*Panax notoginseng*）无菌苗中诱导出的愈伤组织进行了分化试验。结果表明，不同的植物激素对三七愈伤组织的分化具有很大的影响。在 MS 培养基中加入 0.5—1.0 mg／L 的 IBA 或 IAA 能促进愈伤组织根的分化；而加入 0.5—1.0 mg／L 的 BA 则能促进愈伤组织芽的分化，但它们的分化率都不很高。其它的植物激素如 2，4–D，NAA 和 KT 等对三七愈伤组织分化影响不大，但亦改变愈伤组织的生长状态。把在含 BA 的培养基上分化的芽转移至含 IBA 的培养基中培养时，会生长出根，建立了完整的再生植株。再生植株培养于含 1.0 mg／L IBA+0.1 mg／L BA 的 MS 培养基中，能正常生长，其平均生长速率为 75.0 mg DW／L.d。对分化的三七愈伤组织与未分化的三七愈伤组织进行了有效成分之一皂甙含量的比较。结果发现，分化的三七愈伤组织皂甙含量为 3.39%，比未分化的愈伤组织（皂甙含量 1.34%）高 1.5 倍。

关键词　三七；愈伤组织；分化；皂甙含量

STUDIES ON THE CALLUS DIFFERENTIATION FROM PANAX NOTOGINSENG

GAN Fan–Yuan，ZHOU Li–Gang，ZHENG Guang–Zhi
(*Kunming Institute of Botany*，*Academia Sinica*，Kunming 650204)
WU Kui，Li Jian–Ming
(*Yunnan Medicinal Material Company*，Kunming 650031)

Abstract　The test on differentiation of callus from the sterile seedling of *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen was studied. The results demonstrated that the differentiation of *P. notoginseng* callus was obviously influenced by the different kinds of plant hormones. The MS medium containing 0.5—1.0 mg／L IBA or IAA could promote the differentiation of root，and the MS medium containing 0.5—1.0 mg／L BA could promote the differentiation of shoot. But their rates of differentiation were not very high. Other plant hormones such as 2,4–D，NAA or KT did not influenced obviously the callus differentiation，but they could change the growth state of the callus. The root was produced when the shoot which differentiated in the medium supplying BA was transferred to the medium supplying IBA. So the complete regeneration

1991–07–03 收稿，1992–01–09 修回
* 云南省科委应用基础基金资助项目

plants from callus were established. The regeneration plants cultured in the MS medium supplying 1.0 mg/L IBA and 0.1mg/L BA could grow normally. Their average growth rate was 75.0 mgDW/L.d. The saponin contents of the differentiation and dedifferentation calli were compared, and found that the saponin content of differentiation callus was 3.39% dry weight, which increased 1.5 folds to the dedifferentiation callus (the saponin content was 1.34% dry weight).

Key words *Panax notoginseng*; Callus; Differentiation; Saponin content

三七（*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen）主产于我国云南、广西等省区，是我国特产的传统珍贵药材。对三七的研究多在其化学成分分析及药理活性等方面[1,2]。近几年来，作者实验室对三七的细胞培养进行了较广泛深入研究，从三七的细胞培养物中分离了皂甙等有效成分[3,4]。此外对三七也进行了胚状体的培养研究[5]。三七种子萌发困难，特别是在北移过程中种子不能成熟，每年均须从原产地引种，因此有必要对三七进行愈伤组织分化的试验，以提供试管苗栽培技术，缩短栽培时间。

材 料 和 方 法

愈伤组织诱导和培养 三七种子去掉种皮，用0.2%升汞减压消毒灭菌10分钟后用无菌水冲洗干净，然后置于琼脂培养基上培养，诱发出无菌苗，取无菌苗诱导愈伤组织[3]。愈伤组织培养于含2.5 mg/L 2,4-D（2,4-二氯苯氧乙酸），0.1 mg/L KT（激动素）和10%CM（椰子汁）的MS培养基中，培养条件见文献[4]。

愈伤组织分化试验 三七愈伤组织连续继代20代之后，进行愈伤组织的分化试验。取愈伤组织培养于含各种不同浓度激素或不同激素组合的MS培养基中，每天16小时光照，一段时间后，愈伤组织即开始分化，计算愈伤组织分化率。

培养物生长速率及皂甙含量的测定 根据文献报道[3]，测定三七分化和未分化愈伤组织的生长速率和总皂甙含量，并进行比较。

结 果 与 讨 论

不同植物激素对三七愈伤组织分化的影响

不同植物激素对三七愈伤组织的分化具有很大的影响。如表1所示，在MS培养基中附加不同的植物激素，接种愈伤组织，接种量约为30.0 mg DW/瓶。大约培养40天后，愈伤组织即开始分化。但在含1 mg/L的2,4-D，NAA（萘乙酸），KT或不加激素的条件下，愈伤组织没有明显的分化，只是其生长状态发生了一些变化，如愈伤组织变硬、成团等。在含1 mg/L IBA（吲哚丁酸）或IAA（吲哚乙酸）的培养基中，发现从愈伤组织中分化出少量根，在愈伤组织的不同部位有个别芽的分化；而在含1 mg/L BA（6-苄基腺嘌呤）的培养基中，愈伤组织分化出少量的芽。这些分化出的根或芽显然都是正常的。根有根尖、根毛。芽有生长点，能正常发育。这种分化方式具有一定的研究意义。首先，由于在不同激素作用下，愈伤组织只分化出根或芽，因此就能定向地从中分离不同的皂甙成分。其次，可以研究其形态建成与皂甙合成的关系，而不受邻近器官的影响。

不同浓度植物激素对三七愈伤组织分化的影响

在此基础上，对三七愈伤组织分化能力较好的几种植物激素进行了不同浓度试验。结果发现，在所设计的浓度范围内，三七愈伤组织的分化率各不相同（表2）。但相对来说，1.0 mg/L的IBA和IAA或0.5 mg/L的BA对三七愈伤组织分化效果较好。证明三七愈伤组织需要合适的植物激素及浓度才能分化。

表 1　不同植物激素对三七愈伤组织分化的影响

Table 1　Influence of different kinds of plant hormones on differentiation of the callus from *P. notoginseng*

植物激素（mg／L） Plant hormones	分化率（%） Rate of differentiation	分化情况 Sgate of differentiation
MS+2,4-D（1）	0.0	未分化,但愈伤组织变硬成团
MS+IBA（1）	25.0	分化少量根及个别芽
MS+NAA（1）	0.0	未分化,但愈伤组织出现绿斑
MS+IAA（1）	12.5	分化少量根
MS+BA（1）	37.5	分化少量芽
MS+KT（1）	0.0	未分化,但有不同颜色斑块
MS（不加激素）	0.0	未分化,停止生长

表 2　不同浓度植物激素对三七愈伤组织分化的影响

Table 2　Influence of different concentrations of plant hormones on differentiation of the callus from *P. notoginseng*

激素种类及浓度（mg／L） Hormone types and concentrations	接种愈伤组织数（瓶） Numbers of inoculation callus	愈伤组织分化数（瓶） Numbers of callus differentiation	分化率（%） Rate of differentiation
MS+IBA（0.1）	10	1	10.0
MS+IBA（0.5）	12	3	25.0
MS+IBA（1.0）	8	3	27.5
MS+IAA（0.5）	10	1	10.0
MS+IAA（1.0）	12	2	16.7
MS+BA（0.1）	10	1	10.0
MS+BA（0.5）	10	3	30.0
MS+BA（1.0）	8	3	37.5

不同激素组合对三七愈伤组织分化的影响

由于不同激素只能使三七分化成根或芽两部分，而不能同时分化出带根和芽的完整再生植株。因此为了诱导出完整的三七再生植株，我们把对三七愈伤组织分化较好的一些激素进行组合试验，结果见表3。结果表明：当把正常的愈伤组织接种于这些不同组合激素的培养基时，很少见到有正常的完整再生植株出现。而当把分化的芽转移至含 1 mg／L IBA 和 0.1 mg／L BA 和 MS 培养基上时，培养一个月后，在芽基部长出了根，建立起了完整的再生植株（图 1）。但当把分化出的根转移至这些培养基时，很少有继续分化出芽的。因此三七愈伤组织的分化是比较困难的。其要求的条件也比较严格。通过进一步试验，扩大分化再生植株率，有可能用生长出的三七再生植株代替以三七种子为栽培方式的方法，这样可大大缩短三七的栽培时间，提高产量，满足市场的需要。

表 3 不同激素组合对三七愈伤组织分化的影响

Table 3 Influence of combinations of the different kinds of hormones on differentiation of the callus from *P. notoginseng*

激素组合（mg／L） Combinations of hormones	接种愈伤组织数（瓶） Numbers of inoculation callus	愈伤组织分化数（瓶） Numbers of callus differentiation	分化率（%） Rate of differentiation
MS+NAA 0.1+BA 1.0	10	1	10.0
MS+IBA 0.1+BA 1.0	10	0	0.0
MS+IBA 1.0+BA 0.1	12	4	33.3
MS+IBA 1.0+BA 0.5	10	1	10.0
MS+IAA 0.1+BA 1.0	10	0	0.0

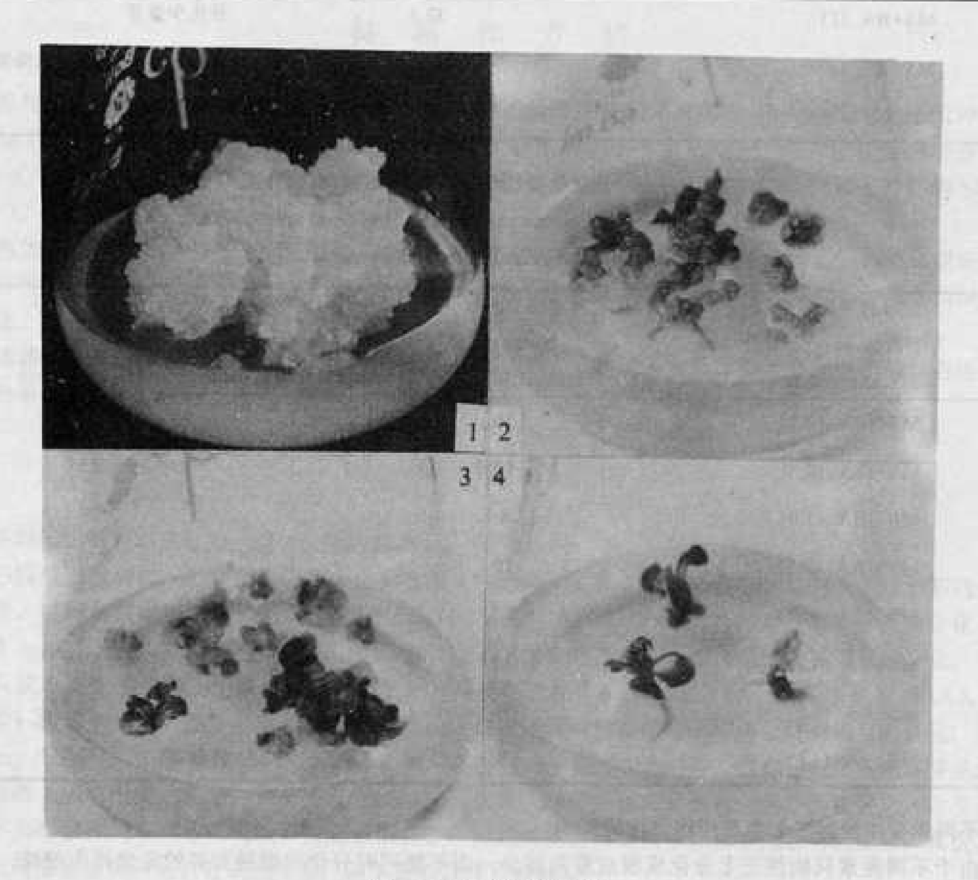


图 1 三七愈伤组织的分化

1. 愈伤组织；2. 愈伤组织分化的根；3. 愈伤组织分化的芽；4. 再生植株

Fig. 1 Callus differentiation from *P. notoginseng*

1. The callus; 2. The root differentiated from the callus; 3. The shoot differentiated from the callus; 4. The regeneration plant differentiated from the callus

三七再生植株的生长状况

把三七再生植株转移至含 1 mg／L IBA+0.1 mg／L BA 的 MS 培养基中培养，观察其生长情况。

结果发现：一个月后，再生植株的地上部分生长较好，但根部分伸长的较多，极少有分枝，主根开始变粗（图1）。地上部分的生长率为108.89 mgDW／L.d。根部分的生长率为41.11 mgDW／L. d，其平均生长率为75.0 mgDW／L.d。低于未分化的愈伤组织的生长率（为337.40 mgDW／L.d）。

三七分化的愈伤组织与正常愈伤组织中皂甙含量的比较

为了观察分化后的三七愈伤组织有效成分之一皂甙积累动态，对他们的皂甙含量进行了测定。结果表明：分化的三七愈伤组织皂甙含量为3.49%，而未分化的愈伤组织其皂甙含量仅为1.34%，分化的愈伤组织的皂甙含量是未分化的愈伤组织的1.5倍。

在我们以前的报道中[3,4]，我们的结果一直显示三七愈伤组织的皂甙含量高于原植株的皂甙含量。现在的实验结果表明，分化的三七愈伤组织的皂甙含量却高于未分化的愈伤组织的皂甙含量，这可能是由于三七愈伤组织已连续继代了20代以上，三七愈伤组织中皂甙含量随继代时间的延长而下降，证明三七愈伤组织其合成皂甙的能力是不稳定的。这种现象在其它的组织培养物中亦有发现[7,8]。因此，需要采取其他措施筛选高产稳产的细胞变异系[9]，或采用低温贮存法[10]保存培养细胞等，使三七的愈伤组织保持高的皂甙生产能力。

三七愈伤组织的分化虽然明显提高了皂甙的含量，但分化并不是培养物产生皂甙的必须条件，也不是提高皂甙含量的唯一方法。例如采用别的方法，改变2,4-D和KT浓度，添加适宜浓度的CM和水解乳蛋白等，均能使愈伤组织中皂甙含量提高两倍以上[3, 4]。加之分化的愈伤组织的生长速率十分缓慢，比未分化的愈伤组织低3.5倍（见“三七再生植株的生长状况”一节）。其皂甙产率也远低于未分化的愈伤组织。

参 考 文 献

〔1〕 杨崇仁，周俊，田中治．人参属植物的化学分类和资源利用．云南植物研究 1988；增刊Ⅰ：47—62

〔2〕 伍杰雄，陈俊秀．三七皂甙对血管平滑肌的作用．中国药理学报 1988；**9**（2）：147—152

〔3〕 Zheng Guangzhi, Wang Shilin, Gan Fanyuan et al. Establishment of *Panax notoginseng* tissue culture. *Chinese Journal of Biotechnology* 1989；**5**（1）：47—54

〔4〕 郑光植，王世林．三七愈伤组织的培养．云南植物研究 1989；**11**（3）：255—262

〔5〕 张琪，佟曦然，张昭等．三七胚培养中的胚胎发生．植物学通报 1989；**6**（4）：236—239

〔6〕 匡海学．人参三七药化药理的研究进展．国外医药．中医中药分册 1982；（6）：1—7

〔7〕 Lindsey K, Yeoman M M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J EXP Bot* 1983；34：1055—1065

〔8〕 Bariaud-Fontanel A, Tabata M. Somaclonal variation in the berberine-producing capability of a culture strain of *Thalictrum minus*. *Plant Cell Reports* 1988；**7**：206—209

〔9〕 甘烦远，郑光植．植物培养细胞次级代谢产物高产细胞系的筛选．国外医药．植物药分册 1990；**5**（1）：10—14

〔10〕 郑光值，何静波，王世林．三分三愈伤组织及悬浮培养细胞的冰冻贮藏．植物学报 1983；**25**（1）：512—518

* *